

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-291295  
(43)Date of publication of application : 03.12.1990

(51)Int.Cl. C12P 21/08  
A61K 39/395  
C12N 5/18  
// C12N 15/06  
(C12P 21/08  
C12R 1:91

(21)Application number : 01-237397  
(22)Date of filing : 14.09.1989

(71)Applicant : RORER INTERNATL OVERSEAS INC

(72)Inventor : SCHLESSINGER JOSEPH  
GIVOL DAVID  
KRIS RICHARD  
BELLOT FRANCOISE

(30)Priority

Priority number : 88 244737 Priority date : 15.09.1988 Priority country : US  
89 319109 03.03.1989 US

**(54) MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC TO HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR AND THERAPEUTIC AGENT USING THE SAME**

**(57)Abstract:**

**PURPOSE:** To improve treatment of cancer diseases by culturing a specific hybridoma cell line in a culture medium.

**CONSTITUTION:** A mouse spleen immunized with a cell expressing a human epithelial cell growth factor(EGF) receptor is taken out to afford a spleen cell. The cell is fused with a mouse myeloma cell in the presence of a fusion promoter to provide a hybridoma. Then, the hybridoma is cloned and transplanted into mouse abdominal cavity to afford ascites fluid or serum which was subjected to tumorigenesis. Then, the serum is purified to produce the objective monoclonal antibody preventing growth of human tumor cell grown by expression of human EGF receptor and mitogenic stimulation by human EGF, binding to the extracellular domain of the human ECF receptor to form an antigen-antibody complex and preventing growth of human oral epidermoid carcinoma cells or human mammary epithelial cells. As necessary, the antibody is combined with antineoplastic agents such as cisplatin to prduce the objective antitumor agent.

⑯日本国特許庁(JP)

⑪特許出願公開

⑫公開特許公報(A)

平2-291295

⑬Int.Cl.<sup>5</sup>

C 12 P 21/08  
A 61 K 39/395  
C 12 N 5/18

識別記号

ADU T

庁内整理番号

8214-4B  
8829-4C

⑭公開 平成2年(1990)12月3日

※

審査請求 未請求 請求項の数 10 (全21頁)

⑮発明の名称 ヒト上皮細胞成長因子レセプターに特異的なモノクローナル抗体及びそれを用いた治療剤

⑯特願 平1-237397

⑰出願 平1(1989)9月14日

優先権主張 ⑯1988年9月15日⑰米国(US)⑯244737

⑲発明者 ジョセフ シュレシン アメリカ合衆国ペンシルベニア州 ウエイン ランパート  
ガードライブ 57

⑳出願人 ローラー インターナ シヨナル オーバーシーズ インコーポレー  
アメリカ合衆国デラウェア州 ウィルミントン シルバー  
サイド ロード 3411 スプリンガー ビルディング  
103  
テッド

㉑代理人 弁理士 齊藤 武彦 外1名  
最終頁に続く

明細書の添書(内容に変更なし)

明細書

抗体がハイブリドーマセルライン ATCC BB9763

1. [発明の名称]

ヒト上皮細胞成長因子レセプターに特異的なモノクローナル抗体及びそれを用いた治療剤

3. 請求項1または2に記載のモノクローナル抗体を產生

2. [特許請求の範囲]

1. ヒトEGFレセプターの発現及びヒトEGFによる細胞分裂刺激により特徴づけられたヒト腫瘍細胞の生育を阻止し、該腫瘍細胞のヒトEGFレセプターの細胞外のドメインに結合し、そして該細胞のヒトEGFレセプターの細胞外のドメインに結合して抗原-抗体複合体となることによりヒト口腔表皮癌(KB)細胞またはヒト乳房上皮細胞(184)の生育を阻止することのできるモノクローナル抗体。

4. (I) マウスをヒトEGFレセプターを発現する細胞で免疫；

(II) 该マウスから脾臓を取り出し、脾臓細胞の懸濁物を作成；

(III) 融合促進剤の存在下該脾臓細胞とマウスマイエローマ細胞とを融合せしめ；

(IV) 融合しなかつたマイエローマ細胞が生育できない培地を含む分離ウエル中で融合細胞を希釈培養し；

2. 该抗体がハイブリドーマセルライン ATCC BB9764によつて產生された108であるか、あるいは該

(V) ハイブリドーマを含有する各ウエル中の上清液中のヒトEGFレセプターに対する抗体の存在を測定；

(VI) ヒトEGFレセプターの細胞外のドメインに結合する抗体を産生するハイブリドーマを選別しクローニ化し；  
そして

(VII) 該クローン上にある上清液から抗体を回収する工程からなることを特徴とする  
ヒトEGFレセプターの細胞外のドメインに結合して抗原-抗体複合体となり、そしてヒトEGFレセプターを発現すると共にEGFにより細胞分裂刺激を受けるヒト癌細胞の生育を阻止することのできるモノクローナル抗体の製造方法。

5. 該工程(VII)が省かれそして該方法はさらに

(VI) 該クローンをマウス腹腔内に移植し；  
(V) 該マウスから腫瘍化した腹水または血清を採取し、  
そして該腹水または血清が所望の抗体を含んでいる

うちのいずれか一つに記載の抗腫瘍剤。

10. 該新生物形成剤がドキソルビシンまたはシスプラチニンである請求項9に記載の抗腫瘍剤。

### 3. [発明の詳細な説明]

#### (産業上の利用分野)

本発明は、新規なハイブリッドセルライン、特にヒトEGFレセプターを発現するヒト腫瘍細胞の生育を阻止することのできる上皮細胞成長因子(epidermal growth factor)(EGF)に対するヒトレセプターに特異性を有するモノクローナル抗体の産生のためのハイブリッドセルライン及びそのようにして產生された抗体及びその抗体を有効成分として含有する医薬及びその抗体を有効成分として含有すると共に抗新生物形成剤を含有する医薬に関する。

#### (従来技術)

細胞の生育は可溶性の成長因子と細胞膜レセプターとの相

工程からなる請求項4に記載の方法。

6. ヒトEGFレセプターを発現すると共にヒトEGFにより細胞分裂刺激を受けるヒト腫瘍細胞の生育を阻止しするモノクローナル抗体を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

7. 該抗体が該細胞のヒトEGFレセプターの細胞外のドメインに結合して抗原-抗体複合体となることによりヒト口部類表皮癌(KB)細胞またはヒト乳房上皮細胞(184)の生育を阻止することができることにより特徴づけられるものである請求項6に記載の抗腫瘍剤。

8. 該モノクローナル抗体がハイブリドーマセルラインATCC HB9764によつて產生された108であるか、あるいは該モノクローナル抗体がハイブリドーマセルラインATCC HB9763によつて產生された96である請求項6または7に記載の抗腫瘍剤。

9. さらに抗新生物形成剤を含有している請求項6～8の

互作用により制御されている。

上皮細胞の細胞分裂刺激(mitogenic stimulation)の最初のステップは上皮細胞成長因子レセプター(EGFレセプター)として知られる膜のグリコプロテインに上皮細胞成長因子(EGF)が特異的に結合することである。

(Carpenter, et al., *Annual Review Biochem.*, Vol. 48, 193-216 (1979))。EGFレセプターは1,186個のアミノ酸からなつており、それは621個の残基からなる細胞外の部分と542個の残基からなる細胞質内の部分とに分けられ、それらは23個の残基からなる单一の疎水性の細胞膜を横断するセグメントによつて結合されている。(Ulrich, et al., *Human Epidermal Growth Factor cDNA Sequence and Aberrant Expression of the Amplified Gene in A-*

431 *Epidermoid Carcinoma Cells, Nature, Vol. 309, 418-425 (1986)*)。EGFレセプターの細胞外の部分は4個のドメインに分けることができる。最近、2個のシスティンのドメインによってその側面を接した残基333から460のドメインⅢがレセプターのEGF結合部分を含んでいるらしいことが示された。  
*(Laz, et al., Localization of a Major Receptor - Binding Domain for Epidermal Growth Factor by Affinity Labelling, Mol. and Cell Biol., Vol. 8, 1831-1834 (1988))*。EGFのドメインⅢへの結合は多面的発現反応(*pleiotropic responses*)を引き起こし、DNA合成及び細胞増殖に導びく。

ヒト腫瘍細胞がEGFレセプターを過剰に発現していることが各種のヒト腫瘍細胞において見出されてきた。例え

*Epidermal - Growth - Factor Receptor Status as Predictor of Early Recurrence and Death From Breast Cancer, Lancet, Vol. 1, 1398-1400 (1987))*。異なるた  
レベルのEGFレセプターを有する無胸腺マウスにヒト外  
陰部類表皮癌(*human vulval epidermoid carcinoma*) (A431)のクローン化変異株を移植しての一連の腫瘍形成性の観察の結果、腫瘍形成性は直接にEGFレセプターの発現レベルに相互関係を持つことが見  
出された。  
*(Santoni, et al., Effects of Epidermal Growth Factor Receptor Concentration on Tumorigenicity of A431 Cells in Nude Mice, Cancer Res., Vol. 46, 4701-4700 (1986))*。こうして、EGFレセプターの過剰な発現は、癌細胞の腫瘍形成のもととなる

ば膀胱の腫瘍の癌様の細胞は比較的多数のEGFレセプターを持つていることが示されている。  
*(Neal, et al., Epidermal Growth Factor Receptor in Human Bladder Cancer : Comparison of Invasive and Superficial Tumors, Lancet, Vol. 1, 366-367 (1985))*。乳癌細胞はEGFレセプター密度と腫瘍の大きさとの間に正の相互関係を持ち、分化の程度とは負の相互関係を持つことを示している。  
*(Sainsbury, et al., Epidermal Growth Factor Receptors and Oestrogen Receptors in Human Breast Cancer, Lancet, Vol. 1, 364-366 (1985); Presence of Epidermal Growth Factor Receptor as an Indicator of Poor Prognosis in Patients with Breast Cancer, J. Clin. Path., Vol. 38, 1225-1228;*

役割をはたしているとされてきている。

EGFレセプター密度の癌細胞の生物的なふるまいに及ぼす影響というものは、該レセプターとそのリガンド——すなわち、EGFまたはトランスホーミング成長因子(*transforming growth factor*) (TGF)との相互作用によつて仲介されうる。大部分の細胞において、EGFがEGFレセプターの特定の領域に結合した場合、細胞はその分裂刺激を受ける。腫瘍性の細胞の上皮細胞成長因子レセプターにモノクローナル抗体を結合させることによりヌードマウスに異種移植した腫瘍細胞A431の*in vivo*での生長阻害をなしたことを二つのグループが報告している。  
*Masui, et al.*はEgG2a及びIgG1イソタイプの抗-EGFレセプターモノクローナル抗体による処置によつて、無胸腺マウスに皮下移植されたA431細胞の腫瘍形成を完全に阻止したことを、その処理を腫瘍

細胞の接種した日から始めて示めした。(Masui, et al., *Growth Inhibition of Human Tumor Cells in Athymic Mice by Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies*, *Cancer Res.*, Vol. 44, 1002-1007 (1984年); *Mechanism of Antitumor Activity in Mice for Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies With Different Isotypes*, *Cancer Res.*, Vol. 46, 5592-5598 (1986))。Rodeck, et al. は Masui の IgG2 α イソタイプのものと異なるモノクローナル抗体を使用し、それは A431 細胞の EGF レセプターに結合し、マウスに異種移植された A431 細胞の腫瘍の生育を完全に阻止した。(Rodeck, et al., *Tumor Growth*

において異なる。KB 及び 184 細胞は高濃度の上皮細胞成長因子により生育刺激されるが、A431 細胞は高濃度の上皮細胞成長因子によつては生育の阻害を受ける。これらの違い並びに抗-EGF-レセプター抗体が *in vivo* での腫瘍の生育を阻止するところのメカニズムの完全な理解がなされていないことは、A431 細胞の EGF レセプターに結合し、そしてヌードマウスに異種移植された A431 細胞に抗腫瘍活性を示したモノクローナル抗体が同様にヌードマウスに異種移植された KB 細胞あるいは 184 細胞に対し抗腫瘍活性を示すのかどうか正確に決定することをさまたげている。

加えて、ヒトの腫瘍細胞はまた上皮細胞成長因子によつて生育刺激を受けることから、KB 及び 184 細胞は、A431 細胞よりもより EGF に対する応答において代表的なパターンを提供するものであり、事実 EGF レセプター

*Modulation by a Monoclonal Antibody to the Epidermal Growth Factor Receptor: Immunologically Mediated and Effector Cell-Independent Effects*, *Cancer Res.*, Vol. 47, 3692-3696 (1987)。

しかしながら、現在までヒト口部類上皮癌 (human oral epidermoid carcinoma) (KB) あるいはヒト乳房上皮細胞 (human mammary epithelial) (184A1N4 及び 184A1N4-T —併せて「184」という) の *in vitro* または *in vivo* での生育を阻止することを誰一人としていない。KB 及び 184 細胞は共に EGF - レセプターに関連した研究に用いられていた。

KB 及び 184 細胞は実質的に A431 細胞とは異なる。特にそれらは上皮細胞成長因子に対する生育応答

を発現するヒト腫瘍細胞モデルとして使用されている。(Willington, et al., *J. Cell Biol.*, Vol. 94, 207-212 (1982))。

腫瘍治療の第一目標は腫瘍細胞をすべて殺すことである。細胞を殺してしまう治療用剤は、細胞毒 (cytotoxic) として定義されている。細胞を殺すというよりは単に細胞の増殖を妨害する治療用剤は、細胞増殖抑制剤 (cytostatic) として定義されている。

EGF レセプターに結合するモノクローナル抗体単独による処置は単に細胞が増えることを阻止しているだけで、これからモノクローナル抗体は細胞増殖抑制剤として作用している。モノクローナル抗体の細胞増殖抑制作用を持つのみということを克服するため、ヒト上皮細胞成長因子レセプターの細胞外のドメインに特異性を有するモノクローナル抗体をマクロファージあるいはマウスの補体と組み合

わせ、A43.1細胞に対する細胞毒反応を得ている。

(Masui, et al., Mechanism of Antitumor Activity in Mice for Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies with Different Isotopes, *Cancer Research*, Vol. 46, 5592-5598 (1986)).

それ自体投与して用いられる抗新生物形成剤あるいは化学療法剤は細胞毒剤として有用である。例えばドキソルビシン(アドリアマイシン)及びシスプラチニンのような抗新生物形成剤の利用は当該分野でよく知られている。しかしながらこれらのものは単独で用いた場合患者に対して毒性があるあるいは副作用があるような量でのみ効果があるのである。シスプラチニンは4週間おきに1回100mg/m<sup>2</sup>の量を静脈内に投与されそしてアドリアマイシンは21日

は、1988年7月25日にAmerican Type Culture Collection, 1230 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852に寄託された。この寄託はブタベスト条約に基づいてなされた。該カルチャーは試料の分譲に係る最新の請求のあつた後すぐなくとも5年間及びいかなる場合であつてもこの寄託の日の後30年間は継続して入手しうる。本発明は、ヒトEGFレセプターを発現するヒト腫瘍細胞の細胞膜上に見出されるEGFレセプターに特異的に結合することにより該腫瘍細胞の生育を阻止する新規なモノクローナル抗体を產生するセルラインを提供するものである。

更に、本発明は、

- (I) マウスをヒトEGFレセプターを発現する細胞で免疫し；
- (II) 該マウスから脾臓を取り出し、脾臓細胞の懸濁物を作

おきに1回60-75mg/m<sup>2</sup>の量を静脈内に投与される。

#### (発明の開示)

本発明は、ヒトEGFレセプターの発現及びヒトEGFによる細胞分裂刺激により特徴づけられたヒト腫瘍細胞の生育を阻止し、該腫瘍細胞のヒトEGFレセプターの細胞外のドメインに結合し、そして該細胞のヒトEGFレセプターの細胞外のドメインに結合して抗原抗体複合体となることによりヒト口部頸表皮癌(KB)細胞またはヒト乳房上皮細胞(184)の生育を阻止することのできるモノクローナル抗体に関する。

本発明は、新規なハイブリドーマセルライン(hybridoma cell lines), ATCC HB9763及び9764に関し、それらはそれぞれその生育培地の上清液の成分として高い特異性を有するモノクローナル抗体、96及び108を与える。セルラインATCC HB9763及び9764

成し；

- (III) 融合促進剤の存在下該脾臓細胞とマウスマイエローマ細胞(mouse myeloma cells)とを融合せしめ；
  - (IV) 融合しなかつたミエローマ細胞が生育できない培地を含む分離ウエル中で融合細胞を希釈培養し；
  - (V) ハイブリドーマを含有する各ウエル中の上清液中のヒトEGFレセプターに対する抗体の存在を測定し；
  - (VI) ヒトEGFレセプターの細胞外のドメインに結合する抗体を產生するハイブリドーマを選別しクローン化し；
  - そして
  - (VII) 該クローン上にある上清液から抗体を回収する工程からなることを特徴とする
- ヒトEGFレセプターの細胞外のドメインに結合し、そしてヒトEGFレセプターを発現すると共にEGFにより細胞分裂刺激を受けるヒト癌細胞の生育を阻止することので

きるモノクローナル抗体の製造法に関する。

本発明は、また上記した工程 (VII) を省き、さらなる工程

(VIII) 該クローンをマウス腹腔内に移植し、

(IX) 該マウスから腫瘍化した腹水または血清を採取し、そ

して該腹水または血清は所望の抗体を含んでいる

を含むことを特徴とするモノクローナル抗体の製造法に関する。

本発明はまた、ヒトEGFレセプターを発現し且つヒトEGFによって細胞分裂刺激を受けるヒト腫瘍細胞の生育を阻止するのに有効な量の新規モノクローナル抗体のいづれか一つと共に医薬担体を含んでなる治療用組成物にも関する。

また、驚くべきことに新規なモノクローナル抗体のうちの一つとドキソルビシンあるいはシスプラチニンのような抗新生生物形成剤と一緒に用いると、ヒトEGFレセプター

あるいはシスプラチニン以外のブレオマイシン硫酸塩、カルムスチン (*carmustine*)、クロラムブシル (*chlorambucil*) 及びシクロホスファミドヒドロキシウレアのよな抗新生生物形成剤もまた新規モノクローナル抗体と一緒に使用することができる。上記であげたものは、単に例としてあげたものであつて、本発明の範囲を限定することを意図したものではない。

本発明は、また有効量の抗新生生物形成剤及び有効量の新規モノクローナル抗体のいづれか一つを、ヒトEGFレセプターを発現し且つヒトEGFにより細胞分裂刺激を受けヒト腫瘍細胞を持つヒト癌患者に投与し、そしてそこで該抗体は腫瘍細胞のヒトEGFレセプターの細胞外のドメインに結合して、抗原-抗体複合体を形成することからなる該腫瘍細胞の生育阻止方法を提供する。

次なるより詳細な説明を、添附された図面と一緒に参照

を発現し且つヒトEGFにより細胞分裂刺激を受けるヒト腫瘍細胞の生育の阻止という点で、単独で抗新生生物形成剤として新規モノクローナル抗体を用いるよりはより有効であることを発見した。本発明者らによる新規なモノクローナル抗体を用いてのこの配合しての処置法は、それが2種の抗癌剤を組み合わせたもので、それぞれは異なるメカニズムによつて作用し、ヒトの腫瘍細胞に細胞毒性を發揮することから優れたものである。このような方法は、一方では薬物に対する抵抗性を増大させるとか、一方では腫瘍細胞を抗体に反応しないようにするその腫瘍細胞の抗原性における変化とかのような臨床上生起する問題を解決することができる。さらにまた、驚くべきことにその抗新生生物形成剤は、それが単独で投与された時必要なそして患者にとって有毒あるいは副作用のある量よりも実質的に比較的小ない量で投与しうることが見出された。ドキソルビシン

して本発明をよりよく理解すれば本発明及び多くのそれに付随した利点のより完全な認識が容易に得られよう。

この記載は本発明を特定のものに限定するためと解すべきでなく、当業者がなしうるような変形も本発明の範囲内であると考えられるべきものである。

第1図はモノクローナル抗体108の $F(ab)_2'$ 及び $F(ab)$ 調製物のドテシル硫酸ナトリウム(SDS)ポリアクリルアミドゲル電気泳動を示す。非還元条件下でゲル泳動はなされた。a) 未処理モノクローナル抗体108、b) 未精製 $F(ab)_2'$ 、フラグメント調製物、c) 精製 $F(ab)_2'$ 、d)  $Fab$  フラグメント、e) 分子量マーカー、KD.

第2図はKB細胞への $^{125}I$ モノクローナル抗体108及びそのフラグメントとEGFとの競合結合を示す。KB細胞は $3 \times 10^{-8}$  Mの $^{125}I$ モノクローナル抗体( $1 \times 10^{-8}$

$\text{cpm}/\mu\text{l}$ ) の存在下、異なる濃度の  $EGF$  (●)、非標識モノクローナル抗体 108 (○)、その  $F(ab)_2$  フラグメント (▲) あるいは  $Fab'$  フラグメント (■) の存在下に培養した。(3 個の独立した測定値の平均)。

第 3 図はモノクローナル抗体 108 の  $KB$  細胞への結合をセルソーター分析したものである。

第 4 図はヌードマウスに移植された  $KB$  細胞に対する  $^{125}\text{I}$  モノクローナル抗体 108 の付着を示す。

第 5 図は  $KB$  細胞のコロニー形成における  $EGF$  及びモノクローナル抗体 108 の及ぼす効果を示す。コロニー形成のアッセイは実施例に記載されているようにして異なる濃度の  $EGF$  (●) 及びモノクローナル抗体 108 (■) の存在下に行われた。

第 6 図は、ヌードマウスに移植された  $KB$  細胞に対するモノクローナル抗体 108 及びそのフラグメントの抗腫瘍

第 8 図はヌードマウスの静脈内に注射された  $KB$  細胞に対する  $108\text{-mAb}$  の抗腫瘍活性を示すものである。

a) 微小転移巣を示している  $1.5 \times 10^6$  個の  $KB$  細胞を静脈内に注射した後 6 日後の肺の組織:  $\times 250$  倍。b) マウスは腫瘍の接種後第 6 日目、第 9 日目及び第 13 日目に 0.5 mg のモノクローナル抗体 108 を静脈内投与されて処置された。それぞれの点は、動物の肺を通して異なる深さで採取された一連の部分の分析を示している。

第 9 図は、皮下に移植された  $KB$  細胞に対する  $108\text{-mAb}$  のドキソルビシンと組み合せた場合の抗腫瘍活性を示している。0.45 mg のモノクローナル抗体 108 と  $3.75 \mu\text{g}$  のドキソルビシンを 4 回ずなわち、腫瘍の注入後 24 時間して及び 3~4 日の間隔をおいて 3 回これを繰り返して投与した。

第 10 図及び第 11 図は皮下に移植された  $KB$  細胞に対

活性を示している。各群は少なくとも 6 匹のマウスからなつていた。マウスは腫瘍の接種の後第 1 日目、第 5 日目、第 12 日目及び第 18 日目にその静脉内に、1 mg のモノクローナル抗体 108 (■)、1 mg の  $DNP$  に対するモノクローナル抗体 (○)、0.66 mg のモノクローナル抗体 108 の  $F(ab)_2$  フラグメント (▲)、あるいは  $Fab'$  フラグメント (◆) を投与して処理された。また、腫瘍細胞を注射した後 1 日して 2 mg のモノクローナル抗体 108 で 1 回処理した (●)。

第 7 図はヌードマウスの腹腔内に移植された  $KB$  細胞に対する  $108\text{-mAb}$  の抗腫瘍活性を示すものである。7 匹のマウスは腫瘍の接種の後第 1 日目、第 4 日目及び第 7 日目にその静脉内に 0.5 mg のモノクローナル抗体 108 (---) または  $DNP$  に対する抗体 (8 匹のマウス) を投与して処理された。

する  $108\text{-mAb}$  のシスプラチニンと組み合せた場合の抗腫瘍活性を示している。第 10 図においては 1.8 mg のモノクローナル抗体 108 及び  $100 \mu\text{g}$  のシスプラチニンを含有するもので 1 回投与処置された。第 11 図では、マウスは腫瘍の移植後 20 時間して 1 回、静脉内に、1.9 mg のモノクローナル抗体 108 及び  $0.1 \mu\text{g}$  のシスプラチニン (*Abic, Ramat-Gan, Israel*) を投与処理された。各物質は別々に注射された。PBS (●)、モノクローナル抗体 (▲)、シスプラチニン (■)、及びモノクローナル抗体 + シスプラチニン (◆)。

第 12 図は細胞の生育に及ぼす  $EGF$  の効果を示している。A)  $184\text{-A1N4}$  細胞。B)  $MDA-468$  細胞。 $184\text{-A1N4}$  細胞は 3 本の 24 - ウエルプレートのウェルに入れられ (5,000 個/ウェル)、 $EGF$  を加えられた。 $MDA-468$  細胞は 3 本の 24 - ウエルプレートの

ウェルに入れられ(5,000個/ウェル)、1晩付着させておかれた。次の日にEGFを加えた。培地を48時間後に交換し、4日後に細胞を数えた。平均(±SD)細胞数を示した。

第13図は、付着依存性の細胞の生育の抗-EGFRレセプター抗体(*aEGFR*)の阻害を示すものである。184A1N4細胞(A及びB)及びMDA-468細胞(C及びD)は3本の24-ウェルプレートのウェルに入れられ(5,000個/ウェル)、抗体を加える前に付着させておかれた。184A1N4の生育培地は1ng/mlのEGFを含有していた。48時間後生育培地を交換し、4日後に細胞を数えた。細胞数(平均±SD)のコントロールに対する%を示した。96 IgM(●)、42 IgM(○)、非特異的なIgM(△)、225 IgG(■)、108 IgG(□)、非特異的なIgG(▲)。

濃度を増大させながら生育させた。60μmより大きいコロニーの数を平均(±SD)で示した。A) IgG: 225 IgG(●)、108 IgG(○)、非特異的なIgG(△)。B) IgM: 96 IgM(○)、42 IgM(●)、非特異的なIgM(△)。

第16図はMDA-468コロニーの形成に及ぼす*aEGFR*の効果を示すものである。細胞は実施例Ⅳ(C)に記載したように軟寒天中で、20nMの*aEGFR*または非特異的な抗体の存在下EGF濃度を増大させながら生育させた。細胞はまたEGF単独下でも生育させた。60μmより大きいコロニーの数を平均(±SD)で示した。A) IgG: 225 IgG(●)、108 IgG(△)、非特異的なIgG(▲)、EGF単独(○)。B) IgM: 96 IgM(○)、42 IgM(●)、非特異的なIgM(▲)、EGF単独(○)。

第14図は、EGFによる付着依存性の細胞の生育の*aEGFR*阻害の逆転を示すものである。細胞は3本の24-ウェルプレートのウェルの中に入れられた(5,000個/ウェル)。184A1N4細胞(A及びB)はEGF及び抗体を加える前にEGFを含まない培地中で4時間付着させておかれた。MDA-468細胞(C及びD)は一晩置いておかれた。抗体を20nMの終濃度となるように加えた。培地を48時間後交換し、4日後に細胞を数えた。細胞数を平均(±SD)で示した。96 IgM(●)、42 IgM(○)、非特異的なIgM(△)、225 IgG(■)、108 IgG(□)、非特異的なIgG(▲)。

第15図はモノクローナル*aEGFR*による184A1N4-Tのコロニー形成の阻害を示すものである。細胞は実施例Ⅳ(B)に記載したように軟寒天中で、20nM *aEGFR*または20nM 非特異的な抗体の存在下EGF

第17図は、MDA-468細胞に結合する<sup>125</sup>I-EGFに及ぼす*aEGFR*の効果を示すものである。24-ウェルプレート中の集密的(*confluent*)MDA-468細胞をヨウ素化したEGF(1nM)及び非標識抗体またはEGFの濃度を大きくしながら2.5時間4°Cでインキュベートした。2または3つの別々の実験からの二つの測定の平均(±SD)を示した。A) 225 IgG(△)、108 IgG(◇)、非特異的なIgG(▽)、EGF標準(●)。B) IgM: 96 IgM(●)、42 IgM(△)、非特異的なIgM(▼)、EGF標準(○)。

#### 実施例 1.

##### モノクローナル抗体の产生

###### A. 免疫及び体細胞のハイブリッド化

*Balb/c* マウスをCH71細胞またはCH71細胞膜調製物の腹腔内への注射により免疫した。CH71細胞は

*EGF-R cDNA*の切断されたかたちのもの (*EGF-R* の細胞内のドメインの大部分が欠失したもの) を有するプラスミドでトランスフェクトされたチャイニーズハムスター卵巣細胞である。 (*Linnash, et al., J. Biol. Chem.*, Vol. 260, 12490 (1986))。このトランスフェクトされた細胞は、ほぼ  $10^8$  個の変異 *EGF-R* 分子/細胞を発現する。*CH-71* 細胞を選ぶことにより、*EGF-R* の細胞外のドメインに対する抗体を分泌するハイブリドーマのみを最初のスクリーニング試験で選択できそしてヒト *EGF-R* 分子に結合しているヒトに特異的な糖類に対して向けられた抗体を選択することを避けることができる。

マウスを第 0 日目、第 13 日目及び第 32 日目の 3 回免疫した。2 匹の最も応答性の良いマウスそれぞれに 3 回 *CH-71* 細胞を 3 日続けて融合前に腹腔内注射して免疫を

*EGF* レセプターを発現していない細胞を 96 ウエルプレート中に入れた。集密状態下、それらを 1 回結合培地 (*DMEM*, 20 mM *Hepes*, 0.2% *BSA*) で洗浄し、異なる生育ハイブリドーマから得られた 100  $\mu$ l のカルチャーの上清と一緒に室温で 90 分間インキュベートした。次に細胞を結合培地で 3 回洗浄し、100  $\mu$ l のヨウ素化したヤギの抗マウス免疫グロブリン (250,000 cpm/100  $\mu$ l) 液と共にさらに室温で 60 分間インキュベートした。*PBS* (リン酸塩緩衝液、pH 7.5) で 3 回洗つた後、細胞をウエルからこすり取り、それらの表面に結合した放射活性をガンマ線カウンターを用いて測定した。抗体の *EGF* レセプターを発現している細胞 (ヒト *EGF-R DNA* 構築物でトランスフェクトされた A 431、ヒト纖維芽細胞またはマウス 3T3 細胞) の表面への特異的な結合能をこの方法で測定し、さらに *EGF* -

促進増強した。次に 65 日目にマウスの脾臓細胞を *NS1* ミエローマ細胞 (比率 5/1) と、融合剤として *PEG* 4000 (*Merck*) を用い、*Kohler* 及び *Milstein* の一般法に従つて融合せしめた。 (*Kohler and Milstein, Eur. J. Immun.*, Vol. 6, 511-519 (1976))。

#### B. ハイブリドーマの選別及び生育

融合生成物をヒポキサンチン-アミノブテリン-チミジン (*HAT*) 選択培地の代わりにヒポキサンチン-アザセリン (*HA*) 選択培地 (*G.Buttin, et al., Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol. 81, 27-36 (1978)) で希釈し、96 ウエルプレートに分けて入れた。

最初にラジオイムノアッセイによつて生育しているハイブリドーマのウエル中の培地の中に特異抗体があるか否か分析した。*EGF* レセプターを発現している細胞あるいは

*R* を発現していない細胞 (マウス 3T3 細胞の特定のクローン) への結合能と比較した。陽性のハイブリドーマを限界希釈をしてクローニ化し、さらに異なる種 (ヒト、マウス、ニワトリ) のセルラインのライゼートから得られた  $^{35}S$  メチオニンまたは  $^{32}P$  で標識された *EGF-R* を免疫沈殿させうるかどうかを測定して調べた。このために、ヤギ抗マウス免疫グロブリンを、プロテイン A - セフアロースに、ヤギ抗マウス抗体溶液とプロテイン A - セフアロースビーズとを室温で 30 分間インキュベートすることにより結合させた。次にこれを 3 回 20 mM *Hepes*, pH 7.4 で洗つた。次にさらにヤギマウス Ig コートしたプロテイン A - セフアロースビーズを 30 分間室温でハイブリドーマのカルチャーの上清液と共にインキュベートし、*INTG* 緩衝液 (20 mM *Hepes*, 150 mM *NaCl*, 0.1% *Triton X-100*, 10% グリセロール) で 3 回

洗浄し、そして、可溶化緩衝液 ( 1 % Triton X - 100, 150 mM NaCl, 20 mM Hepes, 1.5 mM EGTA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % グリセロール、プロテアーゼ阻害剤としてアプロチニン、ロイペプチジン及び PMSF ) でもつて細胞の単層を溶菌化し、ライゼートを遠心して核ペレットを除去して得られたいいろいろな細胞ライゼートと 4 °C で 1 時間インキュベートした。<sup>32</sup>P で標識するため、免疫沈殿物を *BNTG* で 3 回洗い、次に 15 分間 <sup>32</sup>P ATP 液 ( 5 mM MnCl<sub>2</sub> 及び 3 μCi/<sup>32</sup>P ATP 試料を含む *BNTG* ) と共にインキュベートした。次に電気泳動試料用緩衝液を加え、7.5 % SDS - ポリアクリルアミドゲルにかける前に試料を 10 分間 95 °C で煮沸した。モノクローナル抗体 108, 96 及び 42 はすべてヒト EGF-R に対し特異性を持つことが見出された。これらの抗体はまた EGF-R を発現している細胞の表面にヨウ

素化された EGF が結合するのを阻害する能力について調べられた。これら 3 種の抗体は EGF の該レセプターへの結合を阻害するが、その阻害の程度は 96 > 108 > 42 というものであつた。

### 実施例 I

#### セルラインの培養

##### A. ヒト口部類表皮癌細胞 (KB細胞) の培養

口部類表皮癌から誘導された KB 腺癌セルラインは American Tissue Culture Collection から入手された。その細胞は、56 °C で 30 分間インキュベートすることにより補体活性をなくした 10 % ウシ胎児血清を補なつた Dulbecco の修飾 Eagle 培地中で生育させ、そしてグルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン及びビルビン酸ナトリウム中 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>; 95 % 空気下に生育させた。

##### C. 96 IgM 及び 108 IgG2a ハイブリドーマセルラインの培養

108 IgG2a ハイブリドーマセルラインは EGF レセプターを発現している CH 71 細胞でマウスを免疫して生成させ、KB セルラインと同じ条件下に培養した。

96 IgM ハイブリドーマセルラインは、108 IgG2a ハイブリドーマセルラインに対して記載したのと同じ方法で生成させた。

### 実施例 II

#### A. 動物からのモノクローナル抗体 108 の精製

108 IgG2a ハイブリドーマ細胞を注射した動物の腹水を 4 °C で 10 分間 *appendix centrifuge* 中で遠心して澄んだ液とした。4 °C で飽和硫酸アンモニウムをゆっくりと添加して pH 7.5 で 24 時間かけて最後には 45 % ( v/v ) の濃度までにしモノクローナル抗体を沈殿さ

#### B. ヒト乳房上皮細胞 (184 細胞) 及びヒト乳癌細胞 (MDA-468 細胞) の培養

184A1N4 及び 184A1N4-T ヒト乳房上皮細胞は Martha Stampfer, Lawrence Berkeley Laboratory, Berkeley, CA. にてより提供された。184A1N4 細胞は、グルタミン ( 0.6 mg/ml ), ウシ胎児血清 ( 0.5 % ), ヒドロコルチゾン ( 0.5 μg/ml ), インシュリン ( 5 μg/ml ) 及び EGF ( 10 ng/ml ) を補なつた MEM 及び 5 % CO<sub>2</sub> 中で 37 °C で保持された。184A1N4-T は、グルタミン ( 0.6 mg/ml ), ゲンタマイシン ( 40 μg/ml ) 及び 10 % ウシ胎児血清を補なつた MEM ( Biofluids, Rockville, MD ) 及び 5 % CO<sub>2</sub> 中 37 °C で保持された。MDA-468 細胞は、184A1N4-T 細胞と同じ条件及び培地中で培養された。

- 894 -

せた。沈殿を15分間10,000×gで遠心して集め、50%v/vの硫酸アンモニウム液、pH 7.5、4°Cで2回洗浄した。さらに0.14Mトリス緩衝液、pH 8.0中のセファロースCLプロテインA(Pharmacia)のアフィニティクロマトグラフーによつて精製し、0.1Mクエン酸塩緩衝液、pH 3.0で溶出し、次にPBSに対して徹底的に透析してモノクローナル抗体108を得た。

#### B. 動物からのモノクローナル抗体96の精製

96 IgMハイブリドーマ細胞を注射した動物の腹水を4°Cで15分間3000 RPMでlow speed centrifuge 中で遠心して澄んだ液とした。4°Cで飽和硫酸アンモニウム液をゆつくりと加え、pH 7.5で24時間かけて最後には45% (v/v) の濃度までにしてモノクローナル抗体を沈殿させた。沈殿を10,000×gで15分間遠心して集め、pH 7.5、4°Cで50%v/vの硫酸アンモニウム液

ニティクロマトグラフーによつて除去した。Fc部及びより小さなフラグメントをセファロースG-100のゲル戻過により除去した。単価Fab'フラグメントを調製するため、F(ab')<sub>2</sub> (2mg/ml)を37°Cで1時間20mMトリス緩衝液、pH 8.2中で10mMジチオスレイトールで還元した。37°Cで30分間40mMヨードアセトアミド液でアルキル化し、次に4°CでPBSに対して徹底的に透析した。ドテシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE、第1図参照)によつていろいろなフラグメントの純度及び消化が完結していることを分析した。モノクローナル抗体108の<sup>125</sup>I-標識化をクロラミンT法(Hunter and Greenwood, Preparation of <sup>131</sup>Iodine Labelled Human Growth Hormone of High Specific Activity, Nature, Vol. 196, 465-6, (1962))によつて行つ

て2回洗浄した。次に沈殿を溶解し、50mMトリス、0.5M NaClにに対して徹底的に透析した。50mMトリス、pH 7.8、0.5M NaCl中で平衡化したセファロース-3000を使用してゲル戻過によつてこのものを精製した。モノクローナル抗体mAb 96を含有するピーグをプールして、PBSに対して透析した。

#### 実施例 IV

##### モノクローナル抗体108のF(ab')<sub>2</sub>及びF(ab)'フラグメントの精製、比活性及び免疫反応性

モノクローナル抗体108 (5mg/ml)の0.1M酢酸ナトリウム緩衝液pH 3.9の溶液を37°Cで7時間4%W/Wペプシン(Worthington Biochemical Corporation, New Jersey)存在下消化した。2MトリスでpHを8.0にあわせて消化を止め、次に4°CでPBSに対して透析した。残りの未反応のIgG分子をプロテインAアフィ

た。通常約3×10<sup>6</sup> cpm/μg IgGの比活性のものが得られた。<sup>125</sup>I標識108のKB細胞上に現われたEGFレセプターへの結合と競合しうる点で天然のままのモノクローナル抗体108と比較してモノクローナル抗体108のF(ab')<sub>2</sub>及びF(ab)'フラグメントは充分に免疫反応性を有していた(第2図参照)。

#### 実施例 V

##### モノクローナル抗体108の結合性

###### A. 細胞表面EGFレセプターに対するモノクローナル抗体の結合活性

ハイブリドーマ108の上清液の抗体結合活性を間接蛍光免疫分析法により測定した。KB細胞(試料当たり2×10<sup>6</sup>個)をアツセイ前に24時間トリプシン処理し、試験管(Falcon, ポリスチレン製丸底試験管)に入れた。アツセイ前に、KB細胞懸濁液を冷PBSで洗浄し、4°C

で45分間108ハイブリドーマの上清と共にインキュベートした。1%ウシ血清アルブミンを含有するPBSで洗つた後、4°Cで45分間フルオレツセイン標識したウサギ抗マウスIgGと共にその細胞をインキュベートした。細胞試料をPBSに懸濁し、蛍光セルソーター(FACS II, Beckin Dickinson, Mountainview, Ca, USA)でもつて分析した(第3図参照)。レセプター発現の均一性を、ヒトB型肝炎ウイルスに対して作製されたハイブリドーマ(7H01)の上清で観察された染色がないということと比較して少なくとも96%の細胞において陽性の染色があることによつて示した。4°Cでの抗体結合パラメーターのScatchard分析は平均 $2 \times 10^5$ 結合部位/細胞及び $1.8 \times 10^{-9} M^{-1}$ のKDを示した。

#### B. 上皮細胞成長因子とモノクローナル抗体及びそのフラグメントとの競合ラジオイムノアッセイ

#### C. *in vivo*での放射能標識されたモノクローナル抗体

##### 108の分布

KB細胞( $4 \times 10^6$ 個)をヌードマウス(5-6週令)の背部に皮下接種した。14日後腫瘍が約1.2cmの直径に達した時<sup>125</sup>I-モノクローナル抗体108を静脈内あるいは腹腔内に注射した( $5 \times 10^6$  cpm:  $3 \times 10^6$  cpm/ $\mu$ g)。コントロールとしてヒトB型肝炎ウイルスに対する<sup>125</sup>I-モノクローナル抗体7H01 IgG2aを用いた。抗体を投与して4日たつてから動物を殺して、各種組織中の放射活性を測定した。少なくとも各群あたり4匹の動物の平均を示した。(第4図参照)。

標識化したモノクローナル抗体108の静脈及び腹腔内への投与では共に抗体は腫瘍部分に集まつていた。コントロールIgGの投与の場合静脈内投与では腫瘍部では何らの濃度もなかつたが、腹腔内投与の方では腫瘍の縁部に少し

KB細胞(24ウェルプレート中の $10^5$ 個/ウェル; NUNCL)を24時間生育させ、PBSで洗浄し、4°C、あるいは室温で1時間1%ウシ血清アルブミンを含有するDMEM中天然のままの抗体またはそのフラグメントの各種の濃度のものと、<sup>125</sup>I-モノクローナル抗体108(約 $1 \times 10^6$  cpm/ml)存在下にインキュベートした。次に細胞を洗浄し、0.5N NaOH液で可溶化し、その放射活性をカウンター(Konton, Switzerland)で測定した。非特異的な結合は、100倍過剰量の非標識モノクローナル抗体を加えて測定した。結果を、非標識抗体と共にインキュベートした細胞に結合した放射活性の、冷抗体を加えることなしにインキュベートした細胞に結合した放射活性に対するパーセンテイジとして表わした。

EGFは、最大で約70%まで抗体のレセプターへの結合と競合している。(第2図参照)。

存在していた。静脈内投与後96時間での腫瘍部に蓄積した投与物のパーセンテージはそれぞれモノクローナル抗体108で7.8±1.1、モノクローナル抗体7H01(コントロール抗体)で0.8±0.1であり、腹腔内投与ではそれぞれモノクローナル抗体108で7.5±0.4、モノクローナル抗体7H01で1.8±0.2であつた。

#### 実施例 Ⅶ

##### モノクローナル抗体96の結合性

###### A. 上皮細胞生長因子とモノクローナル抗体96との競合ラジオイムノアッセイ

24-ウェルプレート中の洗浄され集密的MDA-468細胞単層を4°Cで2.5時間各種濃度の結合緩衝液(IMEM, 0.1%BSA, 5.0 mM HEPES)中の抗体または非標識EGFと共にあるいはそれらなしにインキュベートした。<sup>[125</sup>I]EGF(S.A. 80-160  $\mu$ Ci/ $\mu$ g, ICN

*Radiochemicals, CA)* を終濃度  $1 \text{ nM}$  となるよう加えた。インキュベーション後、単層細胞を洗浄し、溶菌用緩衝液 ( $10 \text{ mM}$  トリス、 $1 \text{ mM EDTA}$ 、 $0.5\%$  SDS、 $\text{pH } 7.4$ ) でもつて可溶化し、放射活性をガンマ線カウンター (*LKB - Pharmacia*) を用いて測定した。

4種の抗体すべて標識化した *EGF* の結合を阻害することができたが、非特異的な *IgG* または *IgM* は無効であつた。細胞の生長を阻害するのに最も有効であつた2種の抗体 ( $125 \text{ IgM}$  及び  $225 \text{ IgG}$ ) もまた [ $^{125}\text{I}$ ] *EGF* の結合を阻害するのに最も効果があつた。これらの抗体は非標識 *EGF* よりも多くの程度まで [ $^{125}\text{I}$ ] *EGF* の結合を阻害することができた。(第17図参照)

#### 実施例 VII

##### モノクローナル抗体108の有用性

###### A. *KB*細胞のコロニー阻止アッセイ

150%まで増加していた。加えて *EGF* は *KB* 細胞のコロニーの大きさを増加させた。同様の実験をモノクローナル抗体108 ( $1.6 \mu\text{M}$ ) の存在下に行なうと、細胞のコロニー数はコントロール値の30%にまで減少させた。さらに、コロニー数を50%増大させるような濃度の *EGF*と共に100倍過剰量のモノクローナル抗体108ではそのコロニー数をコントロール値の20%にまで減少させた。同じ条件下では、モノクローナル抗体108の *F(ab)₂* フラグメントでは *KB* のコロニー数に何の影響も与えなかつた。しかし、*EGF*に対して100倍過剰な量を用いた時、*F(ab)₂* フラグメントは形成されたコロニーの数に及ぼす *EGF* の効果を打ち消すことができた (150%~103%)。同じ濃度のジニトロフェニル (*DNP*) に対するモノクローナル抗体とのインキュベートでは形成されたコロニー数に何らの影響もなかつた。(第5図参照)。

*KB* 細胞を  $2 \times 10^4$  細胞/皿の濃度でペトリ皿 ( $5.0 \times 15 \text{ nM}^2$ 、*NUNC*) 中にまいた。16~24時間後、培地を、*EGF* を含むあるいは含まないモノクローナル抗体108の天然のものあるいはフラグメント化したものの各種濃度のものを含有する新鮮なもので置きかえた。6日目にカルチャーベースを上記の成分を含有する新鮮な培地に再び植えた。15日目に *PBS* で洗浄し、4%  $\text{V/V}$  ホルムアルデヒドの *PBS* 液で15分間固定し、ヘマトキシリンで染色した。次に形成されたコロニー数 (25細胞) を測定した。

第4図は *KB* 細胞に及ぼす増加する濃度の *EGF* 及びモノクローナル抗体108の効果を示している。*KB* 細胞を *EGF* ( $160 \text{ nM}$ ) にさらすと、その成長因子なしでインキュベートされた細胞に比較して植えた後15日して (処理を開始してから14日後) 測定したコロニー数は

###### B. ヌードマウスにおけるモノクローナル抗体108及びそのフラグメントの抗腫瘍活性

*KB* 細胞 ( $2 \times 10^6$ ) をヌードマウスに皮下注射し、次に腫瘍細胞の注射の後第1日目から始めて1回または数回間隔をおいたモノクローナル抗体108の投与を行なつた。腫瘍パラメーターを週に2回カリパスでもつて測定し、その容積を次式に従つて計算した:

$$\text{腫瘍容積} (\text{nM}^3) = \text{長さ} \times \text{幅} \times \text{高さ}.$$

測定値を確認するため、動物を殺した時に腫瘍の容積と腫瘍の重量との相互関係を評価した。

ヌードマウスにおける *KB* 細胞の生育の阻止能をその抗体について測定した。(第6図参照)。腫瘍接種後第1日目、第5日目、第12日目及び第18日目に動物は1mgのモノクローナル抗体108あるいはコントロールのジニトロフェニルに対するモノクローナル抗体のいずれかを受け

た。フラグメント  $F(ab)_2'$  及び  $Fab'$  は抗体と等量の量投与された。コントロールのモノクローナル抗体で処理された群と比較してモノクローナル抗体 108 で処理された群は顕著に腫瘍の拡大及び生育を阻害した ( $P < 0.017$ 、スチューデントテスト)。 $F(ab)_2'$  は腫瘍の生育に影響を及ぼすことが見出されたが、全抗体よりも効果が劣つていた ( $P < 0.05$ 、第 12 日目、第 17 日目、第 22 日目及び第 25 日日のスチューデントテスト)。 $Fab'$  フラグメントは腫瘍の生育に何の影響も与えなかつた。腫瘍細胞の注射後第 1 日目に天然のままのモノクローナル抗体 108 の 2 mg の 1 回の投与は、腫瘍の接種後第 1 日目、第 5 日目、第 12 日目及び第 18 日目にそれぞれ 1 mg づつ計 4 回処理されたものと同じ効果を有していることが見出された。別の実験において、動物を 0.66 mg の  $F(ab)_2'$  フラグメントで 1 回投与処理した時、抗腫瘍効果はわずかに劣るけれど

の注射について、その腫瘍の注射の後第 6 日目、第 9 日目及び第 13 日目に、5 mg のモノクローナル抗体 108 を計 3 回静脈内注射した。実験の終りに、肺を取り出し、4% ホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに埋め込んだ。 $4 - 5 \mu\text{m}$  の厚さに連続してスライスし、ヘマトキシリソで染色した。肺を通るいろいろな深さの転移性の結節の数が光頭微鏡検査分析法により得られた。動物が有していた肺の腫瘍から 3 種の転移性細胞クローニングを単離し、そのレセプターレベルをアッセイし、レセプターの発現があることがわかつた。抗体による処理は肺の腫瘍の結節の数を、それぞれのコントロールの 15% にまで減少させた。 $(P < 0.05 \text{ Mann-Whitney 分析法})$ 。（第 8 図参照）

#### 実施例 1

##### モノクローナル抗体 96 の有用性

###### A. 184A1N4 及び MDA-468 細胞の生育の 96

も、コントロール群と処理群との間には顕著な差異が *Mann Whitney* 分析法（第 9 日目、第 12 日目、第 14 日目、第 17 日目で  $P < 0.03$ ）及びスチューデントテスト（*student's test*）（第 9 日目、第 12 日目で  $P < 0.05$ ）を用いて見出された。動物を殺した時に腫瘍は測定され、次に重量測定のため取り出された。腫瘍の容積と腫瘍の重量との間の関係係数は 0.95 ( $P < 0.0001$ ) であつた。

##### C. 腹腔内での腫瘍の成長

転移形態の KB 腫瘍を細胞を静脈内 (i.v.) に注射することによつて得ることができた。 $1.5 \times 10^6$  個の KB 細胞を注射されたマウスは、その移植後 4 - 6 週間で肺に腫瘍結節を作つた。この腫瘍モデルは、腫瘍細胞で内部器官に浸透していくという臨床上の条件に似たものである。このことは癌治療の上での主要の問題点である。KB 細胞

##### による阻止

184A1N4 及び MDA-468 細胞を 3 本の 24 - ウエルプレートのウエルの中に入れ (5,000 / ウエル)、抗体を加える前に付着させておいた。184A1N4 の生育培地は  $1 \text{ ng/ml EGF}$  及び  $EGF$  と共に同時に生育培地中に加えられたいいろいろな量の  $EGFR$  抗体を含んでいた。MDA-468 の生育培地はどんな  $EGF$  も含んでいなかつた。生育培地を 48 時間後に交換し、4 日後に細胞を測定した。生育実験の最後に細胞をトリプシン - EDTA でもつて収穫し、*Particle Data* セルカウンター (*Particle Data, Inc., Elmhurst, IL*) を用いて測定した。コントロール細胞数 (平均  $\pm SD$ ) で示した。 $9.6 \text{ IgM} (\bullet)$ 、 $4.2 \text{ IgM} (\circ)$ 、非特異的な  $IgM$  ( $\triangle$ )、 $2.25 \text{ IgG} (\blacksquare)$ 、 $1.08 \text{ IgG} (\square)$ 、非特異的な  $IgG$  ( $\blacktriangle$ )。（第 13 図参照）。

B. 184A1N4細胞に対する96のコロニー阻止アッ

セイ

184A1N4-T細胞を0.4% Bacto-Agar (Difco, Detroit, MI)、IMEM、10% FBS 及び処置を含有する半固体寒天培地中に懸濁した。細胞を3本の1ml IMEM、0.6% 寒天及び10% FBS を含有する35mm培養皿に入れた(10,000個/皿)。10-14日間37°Cで5% CO<sub>2</sub> 中で20nM aEGFR または20nM非特異的な抗体の存在下そしてEGFの濃度を大きくしながらその皿をインキュベートした。60μm より大きなコロニーの数を平均(±SD)で示した。A) IgG: 225 IgG(●)、108 IgG(○)、非特異的な IgG(△)。B) IgM: 96 IgM(○)、42 IgM(●)、非特異的な IgM(△)。直径が60μm より大きな細胞のコロニーは Bausch & Lomb コロニーカウンターを用い

独(○)。直径が60μm より大きな細胞のコロニーは Bausch & Lomb コロニーカウンターを用いて測定した。(第16図参照)。

## 実施例Ⅳ

モノクローナル抗体108のドキソルビシンと共に投与した場合の有用性

KB細胞を注射して皮下に腫瘍をつくつた。腫瘍を注射した後24時間目及び3-4日の間隔を置いて3回、0.45mgのモノクローナル抗体108と37.5μgのドキソルビシン(アドリアマイシン)を計4回投与した。腫瘍の容積をコントロールと比較した: リン酸塩緩衝液、抗体単独あるいは薬剤単独。(第9図参照)

モノクローナル抗体108のシスプラチンと共に投与した場合の有用性

a) 1.8mgのモノクローナル抗体108及び100μgシ

て測定した。(第15図参照)

C. MDA-468細胞に対する96のコロニー阻止アッ

セイ

MDA-468細胞を0.4% Bacto-Agar(Difco, Detroit, MI)、IMEM、10% FBS 及び処置を含有する半固体寒天培地中に懸濁した。細胞を3本の1ml IMEM、0.6% 寒天及び10% FBS を含有する35mm培養皿に入れた(10,000個/皿)。10-14日間37°Cで5% CO<sub>2</sub> 中で20nM aEGFR または20nM非特異的な抗体の存在下そしてEGFの濃度を大きくしながらその皿をインキュベートした。60μm より大きなコロニーの数を平均(±SD)で示した。

A) IgG: 225 IgG(●)、108 IgG(△)、非特異的な IgG(▲)、EGF単独(○)。B) IgM: 96 IgM(○)、42 IgM(●)、非特異的な IgM(△)、EGF単

スプラチニでもつて皮下に2×10<sup>6</sup> 個のKB細胞を接種後24時間して1回投与処理した。結果を第10図に示す。

b) 腫瘍の移植後20時間目に1.9mgのモノクローナル抗体108と0.1μgのシスプラチニを別々の注射器で静脈内に1回投与処理した。配合治療の場合にはそれぞれのものの単独による治療に比して顕著に優れていた(P<0.02, 斯チュードントテスト, P<0.007 Mann-Whitney 分析法)。(第11図参照)

## 4. [ 図面の簡単な説明 ]

第1図はモノクローナル抗体108のF(ab)<sub>2</sub> 及びF(ab)調製物のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)ポリアクリルアミドゲル電気泳動を示す。非還元条件下でゲル泳動はなされた。a) 未処理モノクローナル抗体108、b) 未精製F(ab)<sub>2</sub>フラグメント調製物、c) 精製F(ab)<sub>2</sub>、d) Fab フラグメント、e) 分子量マーカー、

K D。

第2図はKB細胞への<sup>125</sup>Iモノクローナル抗体108及びそのフラグメントとEGFとの競合結合を示す。KB細胞は $3 \times 10^{-9} M$ の<sup>125</sup>Iモノクローナル抗体( $1 \times 10^6 cpm/ml$ )の存在下、異なる濃度のEGF(●)、非標識モノクローナル抗体108(○)、そのF(ab)<sub>2</sub>、フラグメント(▲)あるいはFab'フラグメント(■)の存在下に培養した。(3個の独立した測定値の平均)。

第3図はモノクローナル抗体108のKB細胞への結合をセルソーター分析したものである。

第4図はヌードマウスに移植されたKB細胞に対する<sup>125</sup>Iモノクローナル抗体108の付着を示す。

第5図はKB細胞のコロニー形成におけるEGF及びモノクローナル抗体108の及ぼす効果を示す。コロニー形成のアッセイは実施例に記載されているようにして異なるつ

のマウスは腫瘍の接種の後第1日目、第4日目及び第7日にその静脈内に0.5mgのモノクローナル抗体108(---)またはDNPに対する抗体(8匹のマウス)を投与して処理された。

第8図はヌードマウスの静脈内に注射されたKB細胞に対する108mAbの抗腫瘍活性を示すものである。a)微小転移巣を示している $1.5 \times 10^6$ 個のKB細胞を静脈内に注射した後6日後の肺の組織: $\times 250$ 倍。b)マウスは腫瘍の接種後第6日目、第9日目及び第13日目に0.5mgのモノクローナル抗体108を静脈内投与されて処置された。それぞれの点は、動物の肺を通して異なる深さで採取された一連の部分の分析を示している。

第9図は、皮下に移植されたKB細胞に対する108mAbのドキソルビシンと組み合わせた場合の抗腫瘍活性を示している。0.45mgのモノクローナル抗体108と

た濃度のEGF(●)及びモノクローナル抗体108(■)の存在下に行われた。

第6図は、ヌードマウスに移植されたKB細胞に対するモノクローナル抗体108及びそのフラグメントの抗腫瘍活性を示している。各群は少なくとも6匹のマウスからなっていた。マウスは腫瘍の接種の後第1日目、第5日目、第12日目及び第18日目にその静脈内に、1mgのモノクローナル抗体108(■)、1mgのDNPに対するモノクローナル抗体(○)、0.66mgのモノクローナル抗体108のF(ab)<sub>2</sub>、フラグメント(▲)、あるいはFab'フラグメント(◆)を投与して処理された。また、腫瘍細胞を注射した後1日に2mgのモノクローナル抗体108で1回処理した(●)。

第7図はヌードマウスの腹腔内に移植されたKB細胞に対する108mAbの抗腫瘍活性を示すものである。7匹

$3.75 \mu g$ のドキソルビシンを4回ずなわち、腫瘍の注入後24時間して及び3~4日の間隔をおいて3回これを繰り返して投与した。

第10図及び第11図は皮下に移植されたKB細胞に対する108mAbのシスプラチニンと組み合わせた場合の抗腫瘍活性を示している。第10図においては $1.8 mg$ のモノクローナル抗体108及び $100 \mu g$ のシスプラチニンを含有するもので1回投与処置された。第11図では、マウスは腫瘍の移植後20時間して1回、静脈内に、 $1.9 mg$ のモノクローナル抗体108及び $0.1 mg$ のシスプラチニン(Abic, Ramat-Gan, Israel)を投与処理された。各物質は別々に注射された。PBS(●)、モノクローナル抗体(▲)、シスプラチニン(■)、及びモノクローナル抗体+シスプラチニン(◆)。

第12図は細胞の生育に及ぼすEGFの効果を示してい

る。A) 184A1N4細胞。B) MDA-468細胞。

184A1N4細胞は3本の24-ウェルプレートのウエルに入れられ(5,000個/ウェル)、EGFを加えられた。MDA-468細胞は3本の24-ウェルプレートのウエルに入れられ(5,000個/ウェル)、1晩付着させておかれた。次の日にEGFを加えた。培地を48時間後に交換し、4日後に細胞を数えた。平均(±SD)細胞数を示した。

第13図は、付着依存性の細胞の生育の抗-EGFレセプター抗体( $\alpha E G F R$ )の阻害を示すものである。184A1N4細胞(A及びB)及びMDA-468細胞(C及びD)は3本の24-ウェルプレートのウエルに入れられ(5,000個/ウェル)、抗体を加える前に付着させておかれた。184A1N4の生育培地は1ng/mlのEGFを含有していた。48時間後生育培地を交換し、4日後に

第15図はモノクローナル $\alpha E G F R$ による184A1N4-Tのコロニー形成の阻害を示すものである。細胞は実施例VII(B)に記載したように軟寒天中で、20nM  $\alpha E G F R$ または20nM非特異的な抗体の存在下EGF濃度を増大させながら生育させた。60μmより大きいコロニーの数を平均(±SD)で示した。A) IgG: 225 IgG(●)、108 IgG(○)、非特異的なIgG(△)。B) IgM: 96 IgM(○)、42 IgM(●)、非特異的なIgM(△)。

第16図はMDA-468コロニーの形成に及ぼす $\alpha E G F R$ の効果を示すものである。細胞は実施例VII(C)に記載したように軟寒天中で、20nMの $\alpha E G F R$ または非特異的な抗体の存在下EGF濃度を増大させながら生育させた。細胞はまたEGF単独下でも生育させた。60μmより大きいコロニーの数を平均(±SD)で示した。

細胞を数えた。細胞数(平均±SD)のコントロールに対する%を示した。96 IgM(●)、42 IgM(○)、非特異的なIgM(△)、225 IgG(■)、108 IgG(□)、非特異的なIgG(▲)。

第14図は、EGFによる付着依存性の細胞の生育の $\alpha E G F R$ 阻害の逆転を示すものである。細胞は3本の24-ウェルプレートのウエルの中に入れられた(5,000個/ウェル)。184A1N4細胞(A及びB)はEGF及び抗体を加える前にEGFを含まない培地中で4時間付着させておかれた。MDA-468細胞(C及びD)は一晩置いておかれた。抗体を20nMの終濃度となるように加えた。培地を48時間後交換し、4日後に細胞を数えた。細胞数を平均(±SD)で示した。96 IgM(●)、42 IgM(○)、非特異的なIgM(△)、225 IgG(■)、108 IgG(□)、非特異的なIgG(△)。

A) IgG: 225 IgG(●)、108 IgG(△)、非特異的なIgG(▲)、EGF単独(○)。B) IgM: 96 IgM(△)、42 IgM(●)、非特異的なIgM(▲)、EGF単独(○)。

第17図は、MDA-468細胞に結合する[ $^{125}I$ ]EGFに及ぼす $\alpha E G F R$ の効果を示すものである。24-ウェルプレート中の集密的MDA-468細胞をヨウ素化したEGF(1nM)及び非標識抗体またはEGFの濃度を大きくしながら2.5時間4°Cでインキュベートした。2または3つの別々の実験からの二つの測定の平均(±SD)を示した。A) 225 IgG(△)、108 IgG(◇)、非特異的なIgG(▽)、EGF標準(●)。B) IgM: 96 IgM(●)、42 IgM(△)、非特異的なIgM(▽)、EGF標準(○)。

図面の添書(内容に変更なし)

FIG. 1

a b c d e

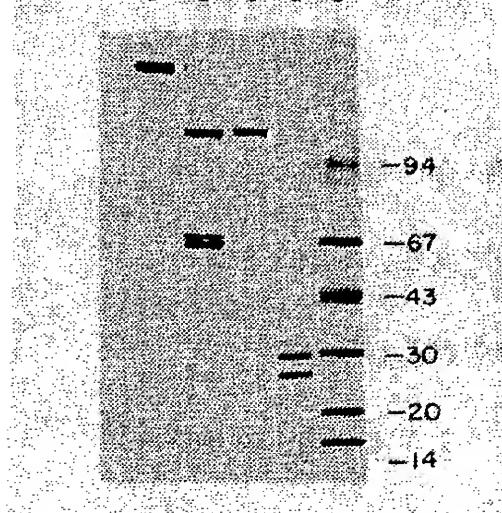


FIG. 3

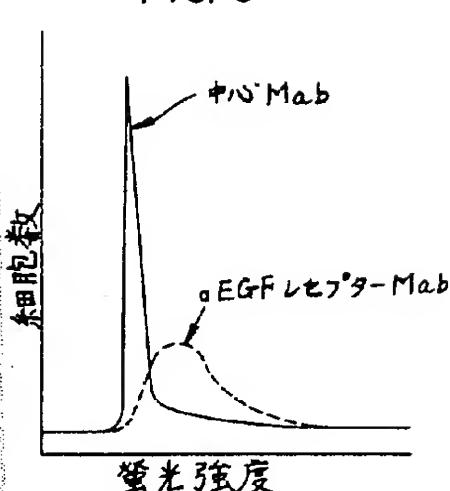


FIG. 2

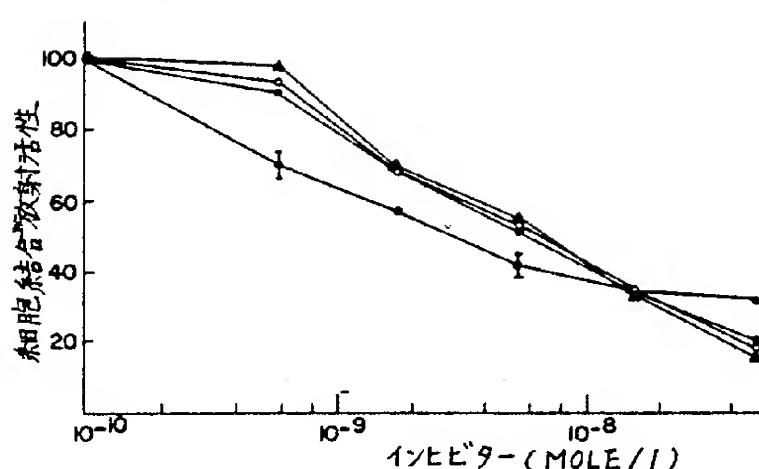


FIG. 4

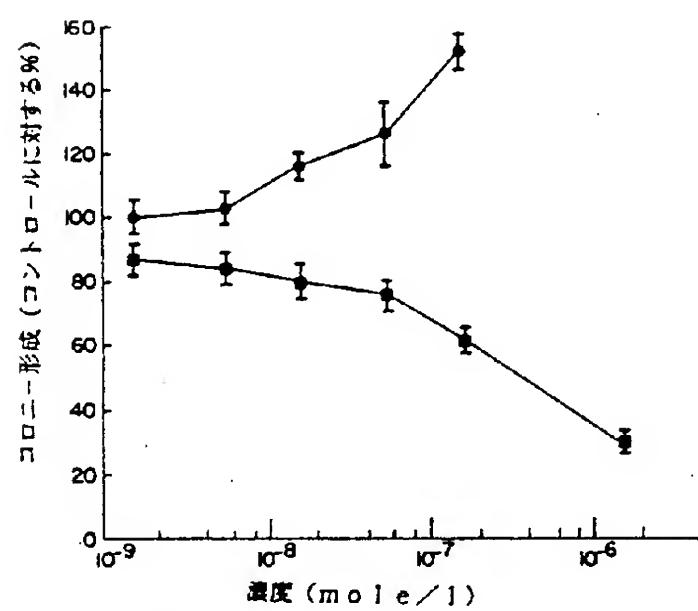
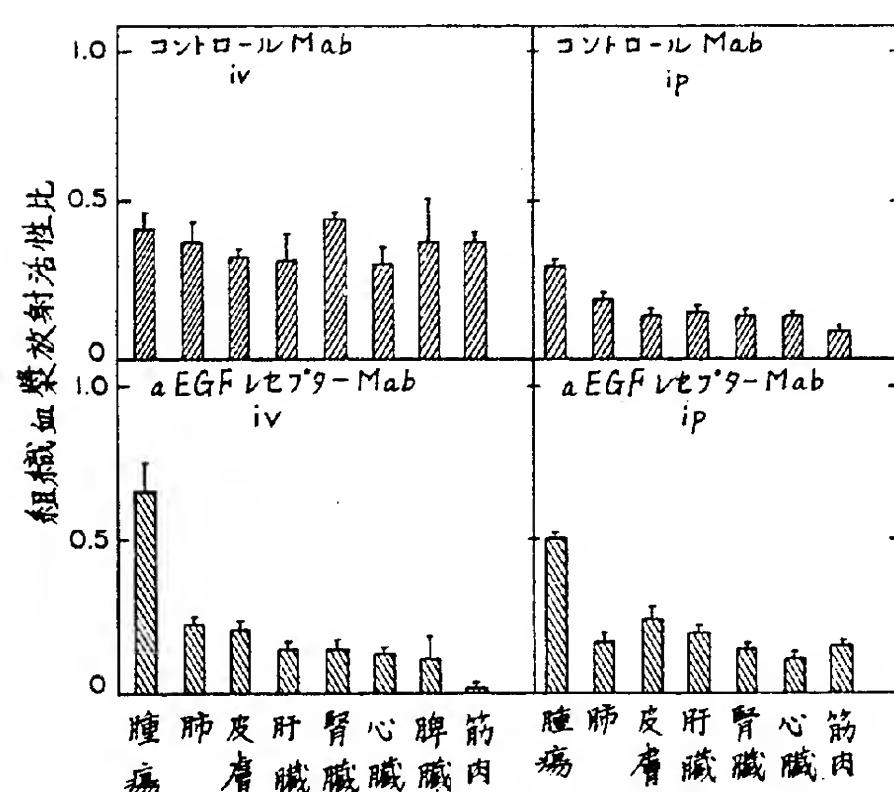


FIG. 5

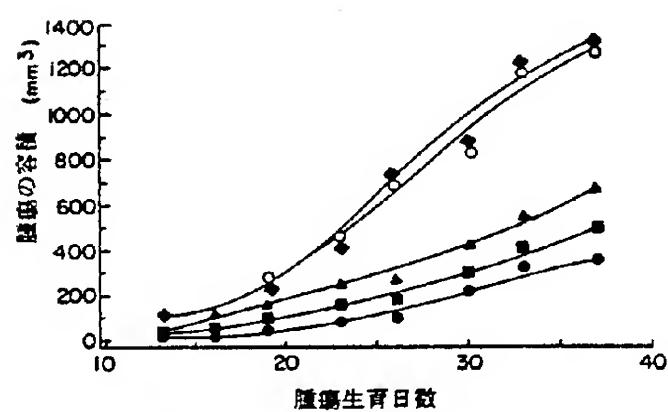


FIG. 6

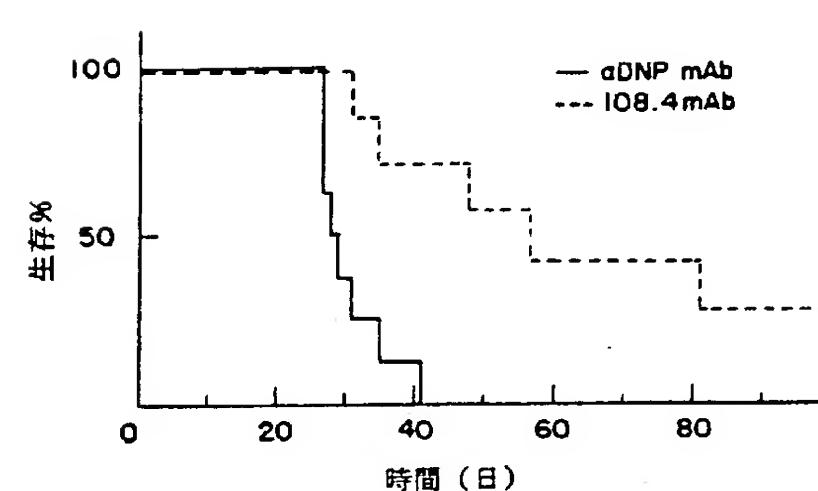


FIG. 7

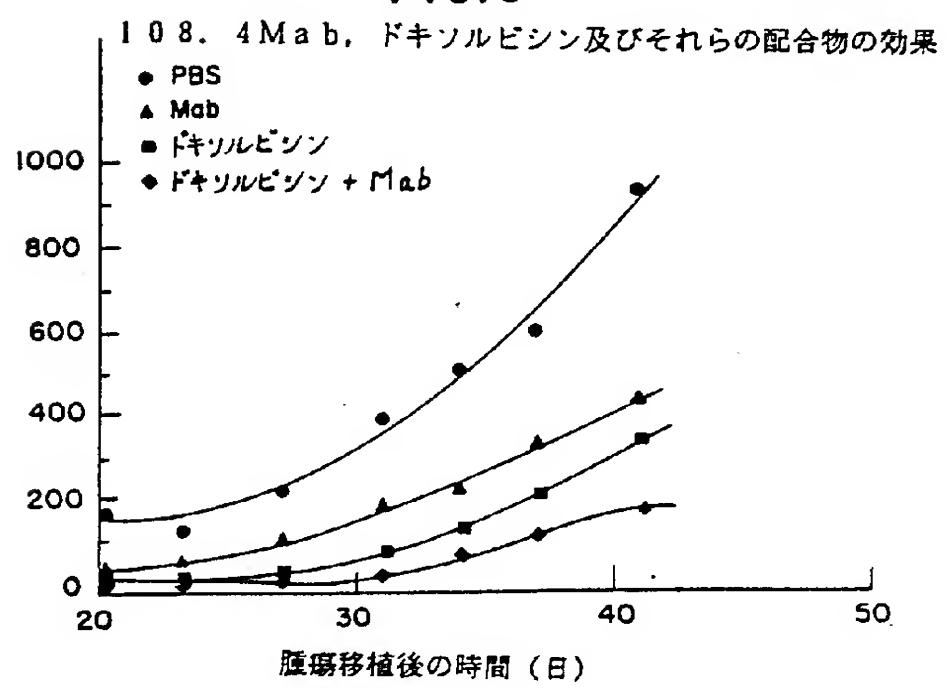


FIG. 8

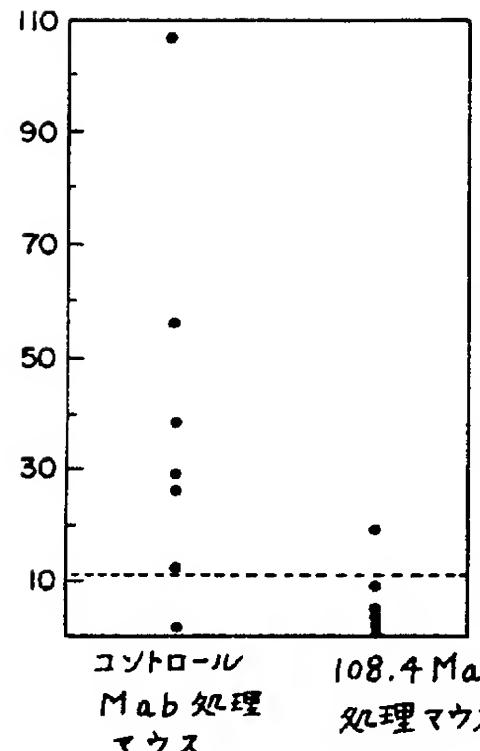
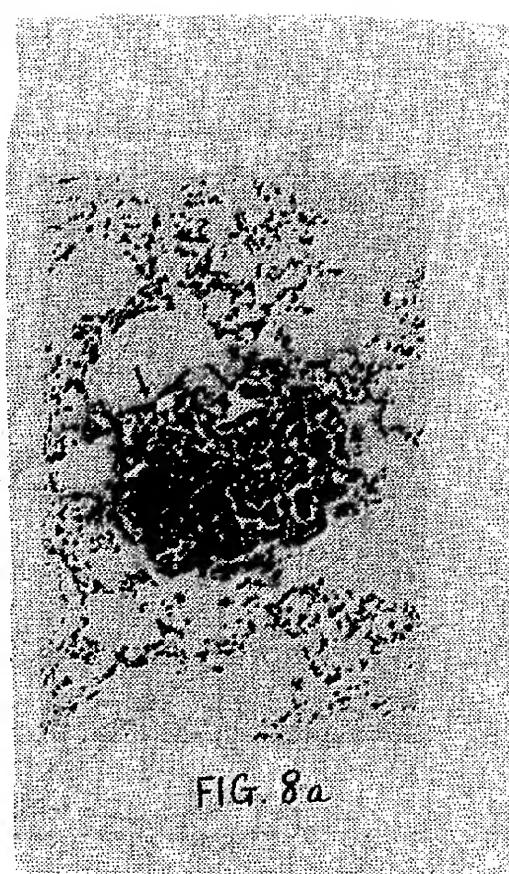


FIG. 8 b



108.4 Mab, cis-DDP 及びそれらの配合物の効果

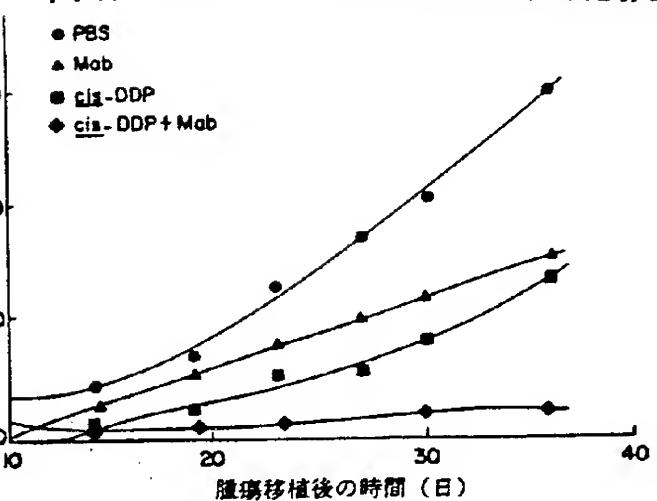


FIG. 10

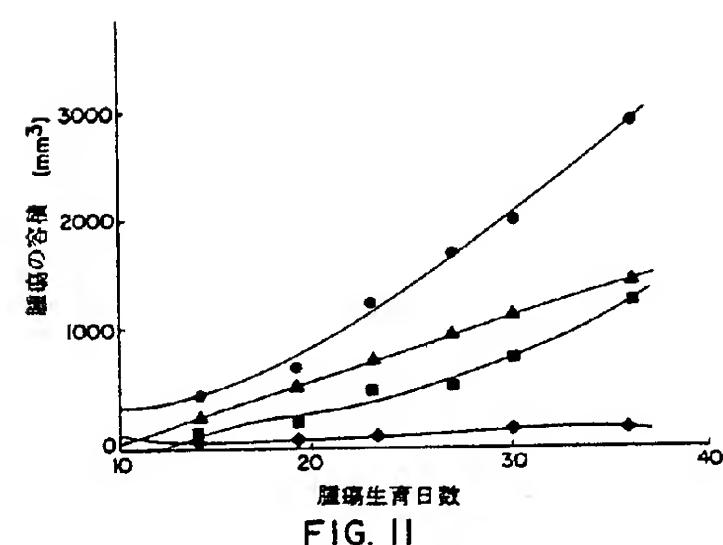


FIG. II

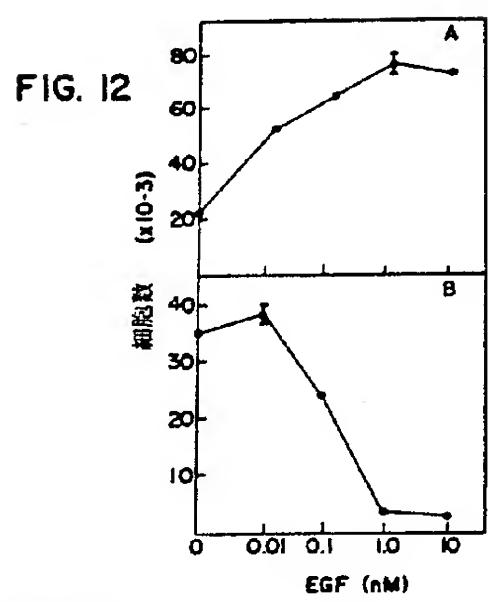


FIG. 13

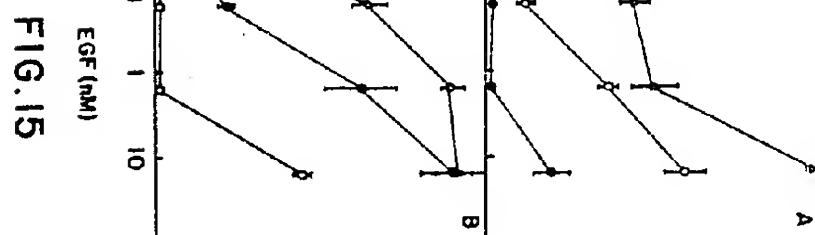
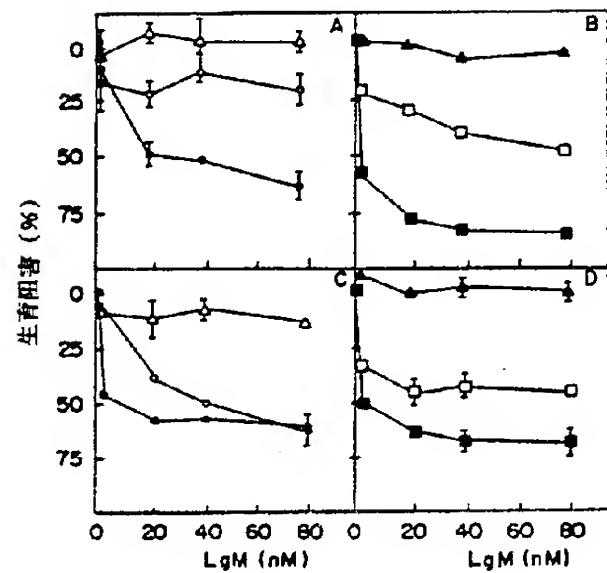


FIG. 15

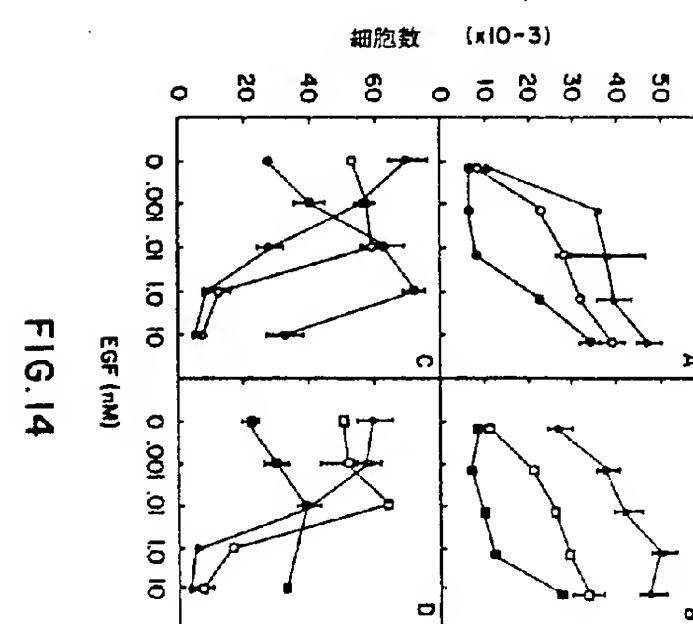


FIG. 14

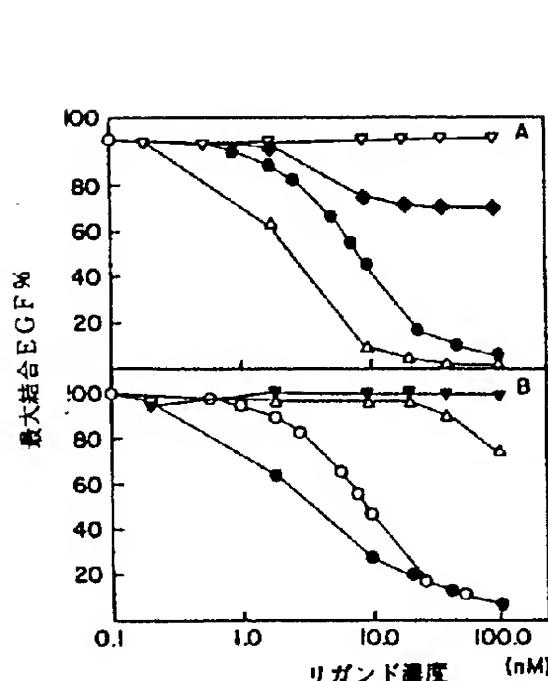


FIG. 17

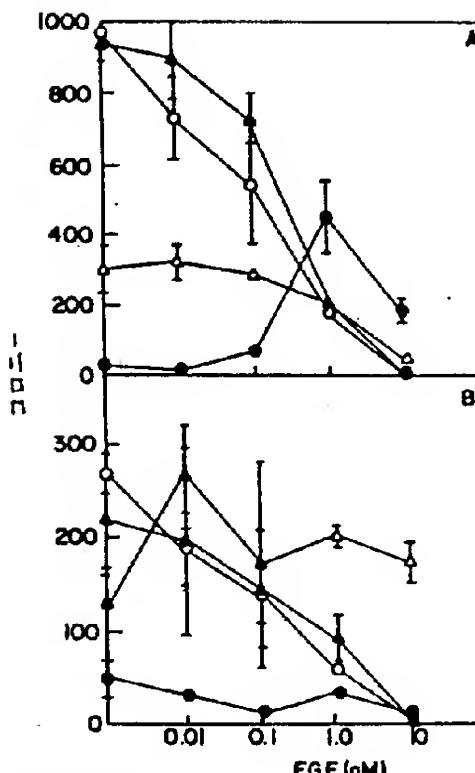


FIG. 16

## 第1頁の続き

⑤Int. Cl.<sup>5</sup>  
// C 12 N 15/06  
(C 12 P 21/08  
C 12 R 1:91)

識別記号 庁内整理番号

優先権主張	③2019年3月3日③米国(US)③319109
⑦発明者	デビッド ギボル イスラエル リホボット ハナシ ハリソン ストリート (番地なし) ヨーロッパ ハウス アパートメント 8
⑦発明者	リチャード ク里斯 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 ランスデール ジャビス レーン 1157
⑦発明者	フランコイズ ベロット アメリカ合衆国ペンシルベニア州 ジエファー ソンビル ビー ウィローブルック ドライブ 348

## 手 続 補 正 書

平成1年10月25日

特許庁長官 吉 田 文 純 殿

## 1. 事件の表示

平成1年特許願第237397号

## 2. 発明の名称

ヒト上皮細胞成長因子レセプターに特異的な  
モノクローナル抗体及びそれを用いた治療剤

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ローラー インターナショナル オーバーシーズ  
インコーポレーテッド

## 4. 代理人

107  
住所 東京都港区赤坂1丁目1番18号  
赤坂大成ビル(電話582-7161)

氏名 弁理士 (7175) 斎藤 武彦



## 5. 補正の対象

願書に添付の手書き明細書の净書

冬  
立候

## 6. 補正の内容

(1) 別紙のとおり、但し明細書の内容の補正はない。

## 6. 補正の内容

- (1) 明細書第58頁12行の「電気泳動を示す。」を「電気泳動を示す写真である。」と補正し、同書第61頁8行の「肺の組織:」を「肺の組織の写真(第8図a):」と補正し、同書同頁12行の「分析を示している。」を「分析を示している(第8図b)。」と補正する。
- (2) 別紙のとおり正式図面を提出し、第8図の図番号を第8図(第8図a, 第8図b)と付記する。(但し図面の内容の補正はない。)

## 手 続 補 正 書

平成2年5月17日

特許庁長官 吉 田 文 純 殿

## 1. 事件の表示

平成1年特許願第237397号

## 2. 発明の名称

ヒト上皮細胞成長因子レセプターに特異的な  
モノクローナル抗体及びそれを用いた治療剤

## 3. 補正をする者

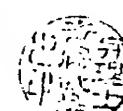
事件との関係 特許出願人

名称 ローラー インターナショナル オーバーシーズ  
インコーポレーテッド

## 4. 代理人

107  
住所 東京都港区赤坂1丁目1番18号  
赤坂大成ビル(電話582-7161)

氏名 弁理士 (7175) 斎藤 武彦



## 5. 補正の対象

明細書の図面の簡単な説明の欄及び願書に添付の図面の净書、並びに第8図の図番号